ISTITUTO D'IGIENE DELLA R. UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
DIRETTO DAL PROF. G. SANARELLI

PROF. GUIDO Q. RUATA
DIRETTORE INCARICATO

LA TOSSICITÀ DELLE CULTURE FILTRATE DI VIBRIONE COLERICO

Memoria letta alla Società Medico-Chirurgica di Bologna
nell' adunanza scientifica del 16 Maggio 1907

BOLOGNA
TIPOGRAFIA GAMBERINI E PARMEGGIANI
Via Altabella, 6 B
1907

Istituto d' Igiene della R. Università di Bologna
diretto dal Prof. G. Sanarelli

PROF. GUIDO Q. RUATA

DIRETTORE INCARICATO

LA TOSSICITÀ DELLE CULTURE FILTRATE DI VIBRIONE COLERICO

Memoria letta alla Società Medico-Chirurgica di Bologna
nell' adunanza scientifica del 16 Maggio 1907

BOLOGNA
TIPOGRAFIA GAMBERINI E PARMEGGIANI
Via Altabella, 6 B
1907

Le ricerche intorno alle sostanze tossiche dei vibrioni colerici hanno condotto da un lato a precisare l' esistenza di una endotossina che è possibile di estrarre dai corpi microbici quando questi, per una cagione qualsiasi, si trovino in via di disfacimento; e poichè essa è inerente alla cellula bacterica, è possibile di ottenere un' immunità attiva contro il colèra mediante la vaccinazione con le culture viventi, attenuate, morte, o con i prodotti della macerazione dei vibrioni.

D' altro canto vari osservatori hanno compiute numerose indagini nell' intento di stabilire se i vibrioni colerici possano secernere una tossina solubile capace di riprodurre il quadro del morbo e di conferire l' immunità.

Così Petri (1) filtrando su candele di porcellana delle culture di vibrioni in acqua peptonizzata ottenne un liquido che insieme a dell' indolo, della tirosina, dell' ammoniaca, conteneva un principio tossico solubile e *termostabile* ch' egli riguardava come un toxopeptone. Il liquido filtrato uccideva, per inoculazione endoperitoneale, una cavia di 196 gr. alla dose di 2 cc., mentre però la dose mortale della cultura intera sterilizzata era notevolmente minore. Secondo Petri, le sostanze che, come l' ammoniaca, si trovano nel liquido filtrato insieme alla sua tossina non sono in quantità bastante ad impartire al filtrato un potere tossico.

Hueppe (2) e Scholl (3) coltivando i vibrioni nelle uova per 15 giorni alla stufa, quindi precipitando con alcool e trattando con acqua il precipitato raccolto e disseccato, in modo da disciogliere la tossina, ottenero un liquido che uccideva in pochi minuti le cavie inoculate nel peritoneo. Ma Gruber e Wiener (4) dimostrarono

(1) *Arbeiten aus dem K. Gesundheitsamte.* 1890, Bd. VI, p. 374.

(2) *Deutsche med. Woch.* 1891, N. 53, p. 417.

(3) *Archiv f. Hyg.* 1892. p. 172.

(4) *Wien. klin. Woch.* 1892, N. 48.

che la tossicità era dovuta all' azione dell' alcool e dell' idrogeno solforato ancor rimasti nel liquido.

Gamaleïa (1) ha descritto due specie di tossine coleriche nel liquido di macerazione di culture di vibrione: l' una termolabile che produce diarrea nei conigli, l' altra termoresistente che li intossica senza produrre diarrea. Avendo Gamaleïa operato sopra vibrioni macerati, le sue tossine, anzichè un prodotto di secrezione attiva, devono ritenersi piuttosto di provenienza endocellulare per il disfacimento del corpo microbico.

Wesbrook (2) ha pure descritto una tossina colerica in culture di vibrioni coltivati su albuminato alcalino.

Ransom (3) ha studiato una tossina solubile molto attiva estratta con la filtrazione da culture in brodo di vibrioni, di cui pure si è occupato Behring (4). Essa resiste alla temperatura di 100° ed agisce istantaneamente dopo l' inoculazione nelle cavie, producendo prostrazione ed ipotermia ed uccidendole quasi subito se inoculata a forti dosi. Con tale tossina sarebbe possibile, secondo Ransom, immunizzare gli animali e prepararne un siero antitossico. Quest' autore non dice però quale età avessero le sue culture quando le filtrava, e Pfeiffer crede che realmente si trattasse di culture vecchie e che perciò la tossina fosse data dalla lisi dei vibrioni.

Metchnikoff, Roux e Salimbeni (5) hanno ripreso la questione della tossina solubile. Essi virulentarono un vibrione del colera di Prussia del 1894 mediante passaggi alternati entro i sacchi di collodio di Sanarelli (6) e per inoculazione diretta nel peritoneo delle cavie. Ottennero così un germe capace di uccidere una cavia per inoculazione intraperitoneale di $^1/_{16}$, di cultura su agar. Il vibrione fu allora coltivato in acqua peptonizzata e gelatinata preparata secondo la formola di Sanarelli (7).

La tossicità cominciava a manifestarsi dalla 24ª ora e raggiungeva il massimo dal 3° al 4° giorno. Essa diminuiva in seguito a misura che le culture si facevano alcaline ed odoranti.

Fu ottenuta così una tossina che uccideva una cavia di 300 gr. in 16-24 ore alla dose di $^1/_3$ di c. c. per 100 gr. d' animale.

L' aggiunta d' un po' di siero al mezzo nutritivo ne aumentava il

(1) *Arch. de Méd. expér.*, 1892.
(2) *Ann. de l' Inst. Pasteur.* 1894.
(3) *Deutsche med. Woch.* 1895, p. 457.
(4) *Deutsche med. Woch.* 1898, p. 294.
(5) *Ann. de l' Inst. Pasteur.* 1896, p. 257.
(6) *Centralbl. f. Bakt.* 1891, Bd. IX, N. 14-15-16.
(7) *Ann. de l' Inst. Pasteur.* 1895, p. 133.

rendimento. La tossina preparata in tal modo è, come quella di Ransom, termostabile; l'azione combinata dell'aria e della luce l'attenuano, mentre si può conservare anche 6 mesi in tubi chiusi alla fiamma.

Negli animali l'intossicazione per mezzo di essa rassomiglia al quadro patologico che sussegue all'iniezione di culture virulenti.

Tale tossina fu impiegata per immunizzare vari animali, specialmente dei cavalli, ed ottenerne un siero anticolerico.

J. Courmont e Doyon (1) poco dopo pretesero di confermare che il vibrione colerico fabbrichi *de son vivant* delle tossine solubili e filtrabili; ma avendo essi impiegato delle culture di 13, 14 e 21 giorni, non è fuori di luogo il supporre che la tossicità dei filtrati fosse per gran parte dovuta ai prodotti della disgregazione dei corpi bacterici, come avremo occasione di vedere.

Collina (2) preparò dei filtrati di culture in brodo (senza però dire di quale età!), i quali, sebbene dotati di proprietà emolitiche, non spiegarono mai all'inoculazione negli animali un'azione distintamente tossica.

Kraus (3) studiò una tossina di un vibrione di Nasik, della collezione dell'Institut Pasteur, isolato dal dott. Simond da feci di colerosi. Le culture filtrate di tal vibrione darebbero una tossina attivissima *termolabile* essendo distrutta a 58°, ed attenuabile con il cloroformio, l'acido fenico e il solfato d'ammonio.

Per Kraus il vibrione Nasik non è un vibrione colerico, giacchè egli contesta, seguendo le idee di Pfeiffer e della sua scuola, che i vibrioni colerici autentici secernano una tossina solubile.

Inoltre Kraus e Pribram (4) studiando i vibrioni isolati al campo di El Tor da Gotschlich (5) dai pellegrini di ritorno dalla Mecca non affetti da colèra e provenienti da Hedjaz, trovarono che questi presentavano le stesse proprietà del Nasik riguardo alla produzione di tossina.

In questo lavoro Kraus dichiara di non esser mai riuscito, con altri Autori, ad ottenere una tossina dalle culture in brodo di vibrioni colerici, secondo il metodo di Metchnikoff, Roux e Salimbeni, e che perciò è partigiano della teoria di Pfeiffer che la tossina colerica non è un prodotto di secrezione del vibrione, ma

---

(1) *Arch. de Physiol. norm. et path.* 1896, p. 785.

(2) *La Clinica Medica,* 1902, N. 11.

(3) *Centralbl. f. Bakt.* I. Orig. 1903, Bd. XXXIV, p. 488.

(4) *Wien. klin. Woch.* 1905, p. 999.

(5) *Rapport au Président du Conseil quaranténaire d'Egypte.* Alexandrie 1905.

una tossina endocellulare. Tuttavia, di fronte ai risultati dati dal vibrione di Nasik e da quelli di El Tor, ritiene che la questione della secrezione della tossina non si possa dire definitivamente chiusa.

Giova però ricordare che dallo stesso Gotschlich i 38 vibrioni da lui isolati ad El Tor — a cui appartengono i 6 studiati da Kraus — sono considerati come *non colerici*, perchè non si lasciano agglutinare dal siero specifico. E questi medesimi resultati sono stati ottenuti da Kraus e Prantschoff (1) studiando insieme al vibrione di Nasik ed ai 6 primi vibrioni di El Tor, anche gli altri 32.

Una tossina solubile secreta dai vibrioni colerici è descritta in un loro lavoro da Brau e Denier (2). Dalla descrizione di essa però (come anche gli Autori ammettono in parte) anzichè un prodotto di secrezione deve considerarsi come un risultato del disfacimento. dei vibrioni macerati e quindi un veleno endocellulare.

Dalle ricerche di cui abbiamo fatta una breve rivista, risulta dunque che le tossine solubili studiate dai diversi Autori come prodotto *attivo* di secrezione dei vibrioni colerici hanno di comune varie caratteristiche, delle quali principalmente ci interessano la termostabilità e la attenuabilità all'aria.

Non partecipa a questi caratteri la tossina dei vibrioni di Nasik e di El Tor, ma non dobbiamo dimenticare che la loro qualità di vibrioni colerici è ancora assai discutibile, come è stato dimostrato da Gotschlich e da Kraus con i suoi collaboratori.

D'altro canto la maggioranza degli Autori, Pfeiffer (3), Kolle (4), Hetsch (5), Sanarelli (6) oltre ai già citati e a molti altri, rifiutano ai vibrioni la proprietà di secernere una tossina, ed ammettono invece, basandosi su numerose osservazioni, una endotossina che può liberarsi solo mediante la morte e il disfacimento della cellula microbica.

Poco prima della sua morte, il compianto dott. Allan Macfadyen pubblicava un lavoro notevolissimo (7) ove esprimeva la stessa

---

(1) *Centralbl. f. Bakt.*, I. Orig. 1906, Bd. XLI, pp. 377 e 480.

(2) *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1906, p. 578.

(3) *Zeitschr. f. Hyg.* Bd. XI, p. 393; Bd. XV, p. 268; Bd. XX, p. 217. *Deutsche med. Woch.* 1896. n. 7 e 8.

(4) In: *Kolle-Wasserman, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen*, III, p. 50.

(5) Ibid. IV_2, p. 1099.

(6) *Ann. de l' Inst. Pasteur*, 1895, p. 129.

(7) *Lancet*, 1906, p. 494. *Centralbl. f. Bakt.* I. Orig. 1906, p. 365.

opinione a proposito d' una tossina endocellulare termolabile da lui estratta dai corpi dei vibrioni, la quale non solamente riproduceva il quadro della malattia ma era anche dotata di buone proprietà immunizzanti. Mac Fadyen propendeva a credere che la tossina di Metchnikoff, Roux e Salimbeni e le altre simili possono essere date dagli elementi tossici del vibrione liberatisi per autolisi e disintegrazione delle cellule.

La questione essendo così controversa, ci è parso interessante ed utile di riprenderla con nuove esperienze, ed indagare se i vibrioni possano secernere attivamente una tossina e quale ne sia la natura e l' entità.

A questo studio siamo stati anche condotti dalle ricerche per l' addietro da noi compite, su consiglio del prof. Metchnikoff, nell' Institut Pasteur di Parigi (1), le quali già fino d' allora lumeggiavano alcuni lati della questione e potevano metterci per una via non ancora battuta e forse buona.

Noi studiavamo allora per quale cagione i vibrioni colerici e colerasimili coltivati nei comuni mezzi nutritivi, a misura che le culture invecchiano perdono le loro caratteristiche morfologiche, e si trasformano — come è noto — in granulazioni. Studiando le modalità di questo fenomeno, noi determinavamo che le granulazioni si formano ben presto nelle culture sia in mezzi liquidi che solidi, cominciando esse a comparire dopo 24 ore ed essendo tutti i vibrioni trasformati entro 10 - 12 giorni: questo periodo è anche accorciato quando le culture si tengono alla stufa a 37°.

Riguardo alle cause di tale trasformazione, dopo alcuni tentativi infruttuosi diretti a riconoscere se i vibrioni secernessero delle sostanze atte ad effettuarla, potemmo dimostrare che « la quantità di ammoniaca formantesi nelle culture dei vibrioni rende il mezzo nutritivo talmente improprio alla loro vegetazione, da indebolirne prima ed arrestarne poi lo sviluppo, e che contemporaneamente i vibrioni stessi, costretti a vivere in un terreno sfavorevole, si deformano fino a presentare le granulazioni descritte ».

Naturalmente il fatto non è solamente dovuto all' ammoniaca ed ai suoi sali, ma anche — come dimostravamo — a tutte le sostanze che pongono i mezzi nutritivi in condizioni inadatte allo sviluppo; onde in linea generale le granulazioni non sono che la conseguenza dell' influenza nociva del mezzo ove i germi son costretti a vivere, in altri termini, dunque, esse rappresentano delle forme di involuzione.

---

(1) *Ann. de l' Inst. Pasteur*, octobre 1905, p. 661.

Senza tuttavia stabilirne le cause, anche Gotschlich e Weigang (1) avevano notata la rapidità con la quale i vibrioni soggiaciono ai fenomeni di involuzione: essi videro infatti che in una cultura di 48 ore a 37° solo il 10 % dei germi vivevano e al 3° giorno solamente l' 1 %.

Ora, data questa condizione generale delle culture dei vibrioni in tutti i mezzi conosciuti, fino a qual punto si può sperare di ottenere da essi una secrezione di tossina, quando sieno capaci di produrla in condizioni normali di sviluppo? Dalle nostre ricerche è lecito dedurre che il periodo migliore per tale produzione si estende fino al momento in cui l' attività vitale del microbio diminuisce o si estingue — nel nostro caso adunque fino a quando il vibrione non cade in preda ai fenomeni di involuzione, che hanno il loro esito finale nelle granulazioni.

Abbiamo detto che queste cominciano a rendersi particolarmente manifeste dal 1° giorno e che al 3° sono già numerose; ma effettivamente la produzione dell' ammoniaca è assai più precoce e siccome le granulazioni rappresentano l' effetto ultimo della sua azione sui germi, non è illogico il supporre che realmente l' indebolimento dell' attività microbica causato dall' ammoniaca cominci prima anch' esso e proceda per un periodo di tempo in cui non si riveli ancora otticamente, fino a giungere poi alla forma granulare che sta ad indicarci il fatto compiuto. In conclusione, dunque, data la possibilità d' una secrezione di tossina da parte dei vibrioni, il periodo di piena attività tossinogena non può essere che assai breve.

Per tacere di altri, un fatto analogo nelle finalità, per quanto per le modalità del tutto dissimile, è stato posto in luce da Marmoreck (2) nel bacillo della tubercolosi. Egli insiste infatti sulle fasi differenti della vita e dell' accrescimento del bacillo di Koch; i microbi giovani da lui designati con il nome di « primitivi » hanno, oltre a delle reazioni coloranti diverse, anche delle qualità biologiche differenti; poichè questi bacilli giovani, che hanno un sottilissimo carapace di cera e di grasso, sono specialmente adatti al lavoro delicato della produzione di una tossina. E che ciò sia è dimostrato dall' osservazione che la secrezione della tubercolina cammina di pari passo con la trasformazione del bacillo primitivo in bacillo più vecchio, la quale si riconosce al cambiamento dell' aspetto del velo che da cereo e trasparente diviene verrucoso ed opaco, e all' apparizione dell' odore specifico.

---

(1) *Zeitschr. f. Hyg.* 1895, Bd. XX, p. 376.

(2) *Arch. génér. de Méd.* 1903, 24 novem. N. 47.

Questo paragone ci sembra opportuno perchè, qualunque ne sieno le cause, noi abbiamo tanto nel vibrione come nel bacillo di Koch una trasformazione profonda delle qualità *primitive* di microbi nella piena normalità delle loro caratteristiche morfologiche e biologiche, della quale si risente intensamente il potere dell' uno conosciuto e nell' altro sospettato di secernere delle tossine.

Non sarebbe certo difficile il rilevare anche per altri microbi dei fatti consimili — del resto ben noti a tutti gli osservatori — in cui sicuramente i prodotti di modificazione dei mezzi culturali per effetto del ricambio esplicano la più dannosa delle azioni sopra le attività microbiche; ed uno studio sistematico diretto a trovare per ciascun germe il terreno di cultura specificamente più adatto, per quanto lungo ed irto di difficoltà, potrebbe forse condurre a resultati di grande valore. Dopo ciò, la legge generale che i microbi tossinogeni richiedono, per secernere il massimo della tossina, delle condizioni di buona e normale vegetazione, le quali sono comprese in un periodo di tempo più o meno lungo, merita appena di essere qui ricordata.

Date queste premesse, rimaneva da chiarire, riguardo ai vibrioni, un punto importante: ossia, poichè il periodo in cui una tossina può essere da essi secreta è forzatamente brevissimo, come spiegare che la tossina descritta segnatamente da alcuni autori sembra prodursi in notevole quantità e possedere un elevato potere tossico?

Noi entriamo dunque con questa domanda nel campo medesimo della natura della tossina e del suo modo di produzione; ed è precisamente per risolvere tale questione che noi ci siamo accinti alle esperienze di cui stiamo per parlare.

Per le nostre ricerche studiammo anzitutto vari microbi riconosciuti come vibrioni colerici tipici: dal dott. Manouélian dell' Institut Pasteur ottenemmo il vibrione « Manila 13, 1906 » e il « B. 1903 » di Brau e Denier; dal dott. Binot un « Saïgon », un « Cassino » e un « Bombay » appartenenti alla collezione dell' Institut Pasteur; dal prof. Kolle di Berna il vibrione « Kolle 74 », e ad essi siamo grati della cortesia usataci.

Fra questi vari germi, dopo ripetute indagini, scegliemmo il vibrione « Kolle 74 », sia perchè più largamente conosciuto, sia perchè la sua virulenza si può assai bene conservare.

Come mezzo di cultura abbiamo impiegata dapprima la peptogelatina Sanarelli (peptone Defresne 2, gelatina Cometa 2, cloruro di sodio 1, acqua 100) che è certamente il terreno d' elezione per il vibrione colerico.

Per dosare la virulenza in modo sempre uniforme abbiamo pra-

ticate le culture in tubi contenenti *esattamente* 10 c. c. del liquido, impiegando per le inoculazioni delle quantità misurate a frazioni di 10.

Dopo ripetuti passaggi per gli animali abbiamo ottenuta una virulenza fissa la cui dose mortale equivaleva, per ogni 100 gr. di animale (cavia), a un decimo e mezzo di una cultura in peptogelatina omogeneizzata accuratamente. La omogeneizzazione della cultura non è difficile perchè la pellicola del « Kolle 74 » è fragilissima e si suddivide finemente nel liquido mediante una prolungata agitazione.

Il massimo di virulenza è dato dalla cultura tenuta a 37° fra il 3° e 4° giorno.

In seguito, dopo varie prove preliminari di filtrazione attraverso candele Berkefeld, abbiamo preferito di abbandonare le culture in peptogelatina stante la grande lentezza con cui filtrano, che poteva esser causa di errore per le nostre esperienze, e ci siamo rivolti all'acqua peptonizzata (peptone Defresne 4, cloruro di sodio 1, acqua 100) nella quale la già constatata virulenza del « Kolle 74 » rimaneva inalterata: onde le nostre esperienze seguenti si riferiscono senz'altro a culture fatte in tale mezzo nutritivo (10 c. c.).

Lo studio dei filtrati delle culture del « Kolle 74 » ci ha portati a determinare una tossicità equivalente a una dose mortale di c. c. 2,5 per 100 gr. di animale di filtrato d'una cultura di 5 a 6 giorni a 37° inoculati nel peritoneo; a 4 giorni di età la cultura dà talvolta un filtrato un po' meno tossico di cui la dose minima è di 3 c. c.

L'azione del filtrato sull'animale è rapida, poichè i primi sintomi cominciano a manifestarsi subito dopo l'inoculazione: l'animale è colto da sussulti bruschi ed insistenti che ne scuotono tutto il corpo e durano qualche minuto; ben presto si raccoglie immobile nella gabbia, il pelo si arruffa, l'addome si fa dolente e dopo qualche ora la cavia si abbatte nè è più capace di alcun movimento spontaneo; la respirazione si fa corta ed affannosa, il corpo si va raffreddando, il collasso sopraviene ben presto e con esso la morte (in media da 10 a 20 ore). Questi sintomi sono proprî della dose minima mortale: aumentando tale dose 2, 3, 4 volte si hanno degli effetti eccezionalmente violenti e rapidi sino ad aversi la morte in pochi minuti.

L'autopsia dimostra un edema gelatinoso nel punto dell'innesto che si irradia talvolta per largo tratto dell'addome ed è accompagnato da emorragie capillari. Il peritoneo è congesto e presenta quà e là dei punti emorragici; si ha un versamento sieroso o siero-sanguinolento più o meno abbondante; anche i visceri della cavità sono notevolmente congesti; spesso, ma non sempre, l'intestino tenue

un contenuto diarroico. La cavità toracica non presenta in genere nulla di rimarchevole.

Un reperto simile è stato descritto da Metchnikoff, Roux e Salimbeni per la loro tossina.

Era anche di grande importanza, dato il concetto che ci guidava, di studiare il decorso della reazione nelle culture e ciò abbiamo fatto con somma cura: abbiamo così constatato che le culture tanto in peptogelatina quanto in acqua peptonizzata, neutre al momento della semina, dopo 12-15 ore presentano di già un'alcalinità bene apprezzabile, la quale si pronuncia sempre più fino a che verso il 3°-4° giorno raggiunge il suo massimo e si mantiene costante; a questo punto una cartina di tornasole rossa esposta all'orificio del recipiente reagisce subito ed intensamente in azzurro. Molto più tardi — dopo 15-20 giorni o più — le culture in acqua peptonizzata possono diventare acide.

Lo studio delle granulazioni anche in queste culture ci ha dimostrato — confermando i resultati del nostro precedente lavoro — che esse principiano già a comparire intorno alle 24 ore e si fanno rapidamente numerose, sino a che verso il 7°-8° giorno, qualche volta un po' più tardi, tutti i vibrioni sono completamente granulati, si da esser resi irreconoscibili. In una parola, adunque, i vibrioni cominciano a risentire ben presto, come abbiamo detto, delle condizioni sfavorevoli del mezzo dovute principalmente alla presenza dell'ammoniaca e dei sali ammonici che eventualmente si sono formati nel liquido.

Riguardo alle proprietà del filtrato, sono notevoli le seguenti caratteristiche: lasciato a sè in tubi o matracci chiusi semplicemente a cotone perde rapidamente la tossicità, come constatarono Metchnikoff, Roux e Salimbeni; ma essi annettevano anche alla luce un' influenza attenuante mentre noi abbiamo trovato che il filtrato perde la sua tossicità esclusivamente in presenza dell'aria; poichè gli stessi tubi chiusi a cotone e mantenuti al buio perfetto si attenuano nell'identica misura di quelli tenuti alla luce. Viceversa il filtrato non perde delle sue proprietà tossiche quando sia conservato in tubi chiusi alla fiamma, non importa se tenuti alla luce o nell'oscurità.

Inoltre il filtrato non perde della sua tossicità quando sia riscaldato a 120°, purchè in tubi chiusi alla fiamma; la perde invece anche a 100° se riscaldato in tubi chiusi semplicemente a cotone.

Dopo queste constatazioni non era difficile pensare che la tossicità del filtrato potesse essere dovuta, per lo meno in gran parte, a qualche sostanza volatile che vi si forma, onde noi — seguendo ciò che dalle nostre precedenti ricerche già sapevamo — ci siamo rivolti a

studiare se l'effetto tossico possa ascriversi, ed in qual misura, all'ammoniaca ed alle altre sostanze volatili che con essa fossero presenti nelle culture.

Si trattava anzitutto di spogliare il filtrato della sua parte volatile, per studiare poi le caratteristiche del residuo, e perciò abbiamo ricorso alla evaporazione nel vuoto.

Il nostro modo di operare è il seguente: Una quantità nota del filtrato viene posta in un pallone immerso in un bagno d'acqua e collegato ad un refrigerante che comunica per mezzo di un matraccio Erlenmeyer con una pompa aspirante ad acqua Il bagno d'acqua viene riscaldato in modo da ottenere nell' interno del pallone una temperatura di 45°-50°. Facendo il vuoto, il filtrato evapora poco a poco sino a ridursi a consistenza quasi solida; il residuo viene quindi riportato esattamente al volume originale. Il reattivo di Nessler, mentre nel distillato rivela per mezzo di un precipitato rosso mattone una notevole quantità d'ammoniaca, nel residuo riportato a volume non dà più che una lieve reazione ammoniacale.

Naturalmente tutte queste operazioni sono compiute nelle condizioni della più assoluta sterilità, come è dimostrato dalle semine di controllo.

Con i filtrati così trattati abbiamo fatte numerose esperienze di inoculazione nelle cavie, paragonandole a inoculazioni con gli stessi filtrati interi; ne riferiamo alcune:

I.

4. 2. 07.

Cultura di « Kolle 74 » in acqua peptonizzata entro grande fiala di Gayon, a 37°.

12. 2. 07.

La cultura è pienamente sviluppata; al microscopio si riscontra che tutti i vibrioni sono trasformati in granulazioni e detriti; la reazione è alcalina.

Viene filtrata per candela Berkefeld e dal filtrato si fanno delle semine che son messe alla stufa per controllarne la sterilità. Esso ha perciò *8 giorni*.

13. 2. 07.

Il filtrato è sterile.

Una metà è destinata direttamente alle inoculazioni, l'altra metà è concentrata nel vuoto e riportata a volume.

Cavia 102. — Peso gr. 230. Riceve in peritoneo 5 c. c. di filtrato intero.

L'animale cade ben presto in preda ai sintomi da noi descritti e muore in circa 10 ore.

L'autopsia dà il solito reperto. Tutti gli organi sono sterili.

Cavia 103. — Peso gr. 245. Riceve in peritoneo 5 c. c. di filtrato concentrato e riportato a volume.

Nessun sintoma apprezzabile, l'animale sopravvive.

Cavia 104. — Peso gr. 240. Riceve in peritoneo 10 c. c. di filtrato concentrato e riportato a volume.

Per varie ore l' animale non presenta sintomi anormali. In prima mattina del giorno 14, però, lo si trova in preda a malessere, abbattuto, con tremiti e fenomeni di paresi. Nel pomeriggio le condizioni si aggravano e l' animale soccombe esattamente 20 ore dopo l' inoculazione.

All' autopsia il peritoneo è alquanto congesto e contiene una notevole quantità di liquido citrino; anche gli organi sono congesti. Le semine fatte rimangono sterili.

È evidente dunque che la tossicità del filtrato è notevolmente diminuita con la evaporazione. Non dobbiamo però dimenticare che tale filtrato apparteneva ad una cultura tenuta alla stufa per 8 giorni consecutivi e che il disfacimento dei vibrioni, rivelato dalle granulazioni, era già molto avanzato; onde la morte della cavia 104 deve, secondo noi, attribuirsi principalmente all' endotossina diffusasi nel liquido dai corpi microbici disfatti.

Le esperienze con filtrati di culture più giovani confortano questo asserto come ora vedremo.

II.

12. 2. 07.

Cultura di « Kolle 74 » in acqua peptonizzata, entro grande fiala di Gayon, a 37°.

16. 2. 07.

La cultura è pienamente sviluppata; al microscopio la maggior parte dei vibrioni sono ancora mobili e morfologicamente normali, non mancano però le granulazioni. Reazione alcalina.

Viene filtrata per candela Berkefeld ed il filtrato portato, con varie semine, alla stufa per controllarne la sterilità. Esso ha perciò *4 giorni*.

17. 2. 07.

Il filtrato è sterile.

Una parte è riservata alle inoculazioni dirette; una parte è concentrata e riportata a volume.

Cavia 111. — Peso gr. 200. Riceve in peritoneo 5 c. c. di filtrato intero. L' animale muore in circa 15 ore con il solito quadro clinico ed anatomopatologico. Sterili le semine.

Cavia 112. — Peso gr. 240. Riceve in peritoneo 5 c. c. di filtrato concentrato e riportato a volume.

Nessun sintoma, l' animale sopravvive.

Cavia 113. — Peso gr. 230. Riceve in peritoneo 10 c. c. di filtrato concentrato e riportato a volume.

Nessun sintoma, l' animale sopravvive.

III.

15. 2. 07.

Cultura di « Kolle 74 » in acqua peptonizzata, entro grande fiala di Gayon, a 37°.

20. 2. 07.

La cultura è pienamente sviluppata. Al microscopio gran parte dei vibrioni sono ancora normali, ma le granulazioni sono già numerose. La reazione è alcalina. Esso ha perciò *5 giorni*.

Viene filtrata per candela Berkefeld e il filtrato portato, con varie semine, alla stufa per controllarne la sterilità.

21. 2. 07.

Il filtrato è sterile.

Una parte verrà inoculata direttamente, una parte è concentrata e riportata a volume.

Cavia 117. — Peso gr. 170. Riceve in peritoneo 5 c. c. di filtrato intero.

L'animale muore in circa 10 ore presentando il quadro solito.

Cavia 118. — Peso gr. 170. Riceve in peritoneo 10 c. c. di filtrato concentrato e riportato a volume.

All'infuori di un malessere passeggero l'animale non presenta alcun altro sintoma e sopravvive.

Cavia 119. — Peso gr. 200. Riceve in peritoneo 12 c. c. di filtrato concentrato e riportato a volume.

Dopo due ore la cavia è abbattuta, e muore in 18 ore con un quadro simile a quello della cavia 117. Sterili le semine.

Cavia 120. — Peso gr. 200. Riceve in peritoneo 15 c. c. di filtrato concentrato e riportato a volume.

Dopo qualche ora l'animale è alquanto abbattuto ma si rimette e sopravvive.

Le nostre esperienze di cui abbiamo riportati gli esempi ora descritti, non lasciano più adito a dubbio alcuno: l'ammoniaca — ed insieme ad essa non escludiamo che esistano altre sostanze tossiche pure *volatili* di natura non ben definibile — ha una parte preponderante nella tossicità dei filtrati delle culture di vibrioni durante i primi giorni di sviluppo.

Non escludiamo, nè per questo solo possiamo escluderlo, che i vibrioni possano secernere della tossina solubile; poichè se la morte della cavia 104 dell'osservazione I può venir riferita, come abbiamo detto, alla presenza di endotossina liberatasi dai corpi microbici disfatti, non si può tuttavia negare la possibilità che una parte di tossina solubile sia stata secreta e che gli effetti di questa accumulati a quella abbiano prodotto l'esito letale. Vero è che se così è accaduto, la quantità di tossina secreta deve essere in quantità assai piccola se da sola, come dimostrano le altre osservazioni, non viene ad interessare seriamente gli animali, a meno che questi si trovino eccezionalmente in uno stato particolare di suscettività.

Infatti che un principio tossico — il quale però potrebbe essere rappresentato tanto dalla tossina secreta dai germi quanto dalla tossina endocellulare liberatasi dai vibrioni disintegrati — sia rimasto nel

filtrato dopo che è stato privato delle altre sostanze per mezzo della concentrazione, sembra dimostrato dall'esempio della cavia 119 morta in seguito all'inoculazione di 12 c. c. di filtrato evaporato e riportato a volume: evidentemente noi ci siamo trovati di fronte ad un animale i cui poteri di resistenza individuali erano minori di quelli degli altri che pure hanno bene sopportato un' inoculazione quasi uguale (cavia 118) o maggiore (cavia 120), e perciò l'organismo di essa più sensibile all'azione del principio tossico ha dovuto soccombere.

Per meglio approfondire la questione abbiamo voluto fare delle indagini per altra via. Noi abbiamo pensato, cioè, che la tossicità perduta per l'evaporazione dal residuo dovrebbe potersi trovare nel distillato e quindi questo possedere un certo grado di tossicità.

Diciamo subito però che se l' idea appare teoricamente attuabile non così è in pratica; poichè noi abbiamo a fare con una sostanza estremamente volatile com' è l' ammoniaca e con altre sostanze — se se ne vuole ammettere la presenza — che sono pure assai instabili per la loro volatilità. Per far queste indagini, d'altra parte, noi non avevamo altra via che quella già usata delle concentrazioni nel vuoto, per rimanere nell'ambito di condizioni d'esperienza uniformi e perciò comparabili alle precedenti. Ricorrere alla combinazione dell'ammoniaca nel distillato mediante i soliti mezzi chimici ci sembrava inadatto, poichè si sarebbero così alterati singolarmente i termini dell'esperimento. Nè potevamo pensare a far dei dosaggi d'ammoniaca nel liquido filtrato e quindi preparare delle soluzioni ammoniacali dello stesso titolo ed inocularle, e ciò per due ragioni: la prima che un simile determinismo presenta delle cause molteplici e continue di errore, quando sia applicato d' un lato a sostanze complesse quali sono i liquidi culturali, e dall' altro ad elementi d' indagine così delicati quali sono gli animali; la seconda è che con questo mezzo noi veniamo a prender di mira la sola ammoniaca trascurando le altre sostanze volatili delle quali — come abbiamo già detto e come vedremo ancora — un' azione tossica è tutt' altro che improbabile.

Quindi non ci rimaneva che tentare l' evaporazione nel vuoto già praticato nelle precedenti esperienze, inoculandone poi il distillato — ed è ciò che abbiamo fatto.

I risultati, confessiamolo fin d' ora, sono lungi dall' essere concludenti.

Delle culture in acqua peptonizzata, entro grandi fiale di Gayon, sono tenute alla stufa a 37° per 5 giorni (11-16 marzo 1907) quindi passate su carta da filtro e filtrate poi per candela Berkefeld. Una parte del filtrato è destinata ad essere direttamente inoculata e l' altra parte viene evaporata nel vuoto a 50° ed il distillato ne è raccolto; questo con il reattivo di Nessler dà una reazione ammonica pronunciatissima.

Il residuo viene riportato a volume per essere pure inoculato.

17. 3. 07.

Cavia 150. — Peso gr. 210. Riceve in peritoneo 5 c. c. del filtrato intero. Muore in circa 13 ore e presenta il quadro solito. Sterili le semine.

Cavia 151. — Peso gr. 230. Riceve nel peritoneo 10 c. c. di filtrato concentrato e riportato a volume.

Nessun sintoma di entità, l' animale sopravvive.

Cavia 152. — Peso gr. 260. Riceve in peritoneo 10 c. c. di distillato. Presenta un lieve abbattimento passeggero entro la prima ora dall' inoculazione, e si rimette.

Cavia 153. — Peso gr. 240. Riceve in peritoneo 15 c. c. di distillato. Presenta quasi subito un po' di malessere e si rimette.

Cavia 154. — Peso gr. 260. Riceve in peritoneo 20 c. c. di distillato. Malessere iniziale che presto scompare.

Questi resultati negativi debbono secondo noi attribuirsi al fatto già prima accennato che l'azione dell'aspirazione con il vuoto (e a questo riguardo la pompa da noi adoperata è efficacissima) non si esercita solamente sul liquido originale destinato all' evaporazione, ma anche nel recipiente ove il distillato è raccolto, si da estrarre molta parte dell'ammoniaca e delle altre sostanze volatili che effettivamente se ne sfuggono per il tubo aspirante. Onde queste osservazioni non ci offrono elementi di esattezza bastanti per farci concludere per la tossicità o meno del distillato; e perciò rimane ancora integro il fatto precedentemente constatato, che cioè la tossicità del filtrato si perde coll' evaporazione.

Questa nozione ci dà la spiegazione naturale — come lo prevedevamo — dei due fatti già da noi dimostrati, ed in parte anche da Metchnikoff, Roux e Salimbeni, riguardanti l' azione distruttiva dell' aria nel principio tossico del filtrato, e la termostabilità di esso: cioè che quando il filtrato sia mantenuto anche per lungo tempo chiuso alla fiamma, le sostanze volatili non possono liberarsi e perciò ne mantengono inalterata la tossicità; mentre quando i tubi sono semplicemente chiusi a cotone la tossicità si perde perchè le sostanze volatili sfuggono. Ed analogamente un riscaldamento a 100° dei tubi chiusi a cotone promuove la volatilizzazione di quelle sostanze, mentre che la tossicità non si modifica quando il filtrato è scaldato a 120° in tubi chiusi alla fiamma dai quali le sostanze volatili non possono liberarsi.

Queste nuove vedute derivanti dalle nostre osservazioni sui principi tossici delle culture dei vibrioni dovevano sin da principio portarci a studiare se, potendo eliminare dai liquidi culturali l' ammoniaca, ovvero impedirne la formazione, si modificasse anche la tossicità dei filtrati interi ed in quale misura. Naturalmente noi non potevamo

prendere di mira che la produzione dell' ammoniaca, perchè se anche sospettavamo, come sospettiamo tutt'ora, il concorso di altre sostanze volatili ad azione tossica, non per questo ci era dato — essendo esse perfettamente sconosciute — di intraprendere delle esperienze dirette ad accertarne non solo la presenza ma anche per quanta parte entrino nella tossicità totale.

A ciò fare ci si presentavano varie vie:

1. Eliminare l'ammoniaca con il mezzo solito della evaporazione dei filtrati per poi riportarli a volume con dell'acqua peptonizzata e riseminare dei vibrioni nuovi per sostituire quelli già in parte degenerati, e fu questo infatti il primo mezzo da noi impiegato. Ma dovemmo presto abbandonarlo perchè data la grande rapidità con cui l'ammoniaca si forma e la quantità che se ne produce, le operazioni erano necessariamente lunghe e complesse e perciò non sarebbero state scevre di errore ed i risultati non esenti di obiezione. Nella migliore delle ipotesi poi, devesi anche notare come anche a malgrado della concentrazione una certa parte d'ammoniaca, forse salificata, rimanga nel residuo; ora questa parte è certamente trascurabile di per sè sola, ma in varie successive concentrazioni può accumularsi ed influire non poco sulla tossicità finale e totale.

2. Neutralizzare periodicamente mediante un acido l'ammoniaca dopo che si è prodotta. Ed infatti abbiamo tentato questo mezzo impiegando l'acido lattico, poichè sapevamo dalle nostre precedenti osservazioni che il lattato d'ammonio non ha influenza nella formazione delle granulazioni. Esso è però imperfetto perchè l'ammoniaca che si viene formando fra un periodo e l'altro di neutralizzazione esplica certamente un'azione dannosa sui vibrioni: di più i precipitati che si hanno e che rimangono sospesi nel liquido in particelle finissime rendono assai disagevole la filtrazione oltre che possono fissare un'eventuale tossina prodottasi. Con questo metodo infatti non abbiamo avuto che dei resultati poco attendibili, onde l'abbiamo abbandonato.

3. Anzichè precipitare periodicamente l'ammoniaca già formata nelle culture, abbiamo pensato allora di neutralizzarla a misura che si sviluppa (ammoniaca nascente) mediante sostanze a ciò capaci che, o siano costantemente presenti nel mezzo culturale o che si vengano in esso formando parallelamente all'ammoniaca.

Cosi, aggiungendo al liquido di cultura della fibrina o dell'albumina d'uovo coagulata a spugna, queste dovrebbero per la loro funzione acida produrre la neutralizzazione dell'alcali (ammoniaca) che vi si sviluppa e che le attacca. Tale metodo non dà però dei buoni resultati per varie difficoltà e prime di tutte quella della filtrazione.

Ci siamo perciò rivolti ad un altro mezzo — di ottenere cioè delle

culture di vibrione associate ad un microbio non patogeno che per effetto delle sue funzioni vitali producesse degli acidi o un acido capace di neutralizzare l' ammoniaca a misura della sua formazione.

Indicatissimo a questo scopo appariva subito il *bacillo bulgaro* le cui proprietà acido-genetiche sono state così bene poste in luce da Metchnikoff (1) e dalla sua scuola. Come è noto, esso si sviluppa in modo particolarmente rigoglioso su latte e siero di latte, onde tutta la difficoltà stava nel trovare un mezzo che fosse ugualmente favorevole al vibrione e al bacillo bulgaro. Scartato il latte perchè malamente filtrabile, abbiamo preparato del siero di latte secondo il metodo di Petrusky ed in essi abbiamo coltivati separatamente il bacillo bulgaro ed il « Kolle 74 »; questo però non vi dà che delle culture lentissime e stentate, nè solo il « Kolle 74 » ma anche gli altri vibrioni da noi provati (« B. 1903 », « Saïgon », « Bombay », « Cassino », « Manila ») si comportano nella stessa guisa. Non era dunque il siero di latte il mezzo più indicato.

In siero di latte con aggiunta di peptone e lattosio invece i resultati sono molto migliori. Questo mezzo nutritivo, che è anche un ottimo terreno di cultura generale, è da noi preparato nel modo seguente:

Due litri di latte fresco vengono coagulati a 40° in bagno-maria con una soluzione di acido cloridrico al 10 %; il siero formatosi viene filtrato a freddo su carta Chardin ed il suo volume riportato a due litri con acqua distillata. Si aggiunge 1 % di lattosio, si neutralizza con carbonato o idrato di sodio, si cuoce a 100° per mezz' ora e si filtra su carta bagnata a freddo ottenendosi — al bisogno con più di un passaggio — un liquido limpido. A un litro e mezzo di esso si aggiunge una soluzione di 60 gr. di peptone Defresne in 500 cc. di acqua preparata come la solita acqua peptonizzata, per modo che la massa conterrà il 3 % di peptone; si distribuisce e si sterilizza a 100° per 3 giorni consecutivi, 15 minuti alla volta. Talvolta giova di aggiungere al mezzo della tintura di tornasole.

In questo liquido culturale tanto il vibrione quanto il bacillo bulgaro si sviluppano benissimo. Studiando però il corso della reazione ci accorgemmo subito che in esso il vibrione dà presto un' acidità notevole, segno evidente che ne è attaccato il lattosio a spese del quale si produce dell' acido lattico, come era già stato constatato da Kuprianow (2), e non solamente per il lattosio, ma anche per gli altri zuccheri.

---

(1) Metchnikoff. *Essais optimistes*; Maloine édit., Paris 1907, pag. 232 e seguenti.

(2) Cit. in Courmont. Précis de Bacteriologie, 1907, p. 750.

Tutti i vari stipiti di vibrioni colerici si comportano nello stesso modo: noi abbiamo fatte delle osservazioni comparative con il « Kolle 74 », il » Saïgon » ed il « Manila » seminati in vari mezzi, e ne diamo i resultati riassunti nella Tabella riportata alla pagina seguente:

Dopo di che restava inutile di provocare ancòra una simbiosi fra il vibrione e il bacillo bulgaro perchè lo scopo era di già raggiunto.

Abbiamo perciò seminato con il « Kolle 74 » una serie di fiale di Gayon contenenti acqua peptonizzata per il controllo, ed una serie contenenti il siero di latte peptonizzato e lattosato portandolo subito dopo alla stufa a 37° (11 febbraio 1907).

13. 2. 07.

Le culture sono pienamente sviluppate: quelle in acqua peptonizzata sono alcaline, le altre neutre o alcaline lievissime.

Si filtrano due culture, una per ispecie, su candela Berkefeld e si inoculano subito (culture di *2 giorni*).

Cavia 100. — Peso gr. 220. Riceve in peritoneo 8 c. c. di filtrato di cultura in siero di latte peptonizzato e lattosato (reazione neutra).

Nessun sintoma, l' animale sopravvive.

Cavia 101. — Peso gr. 230. Riceve in peritoneo 5 c. c. di filtrato di cultura in acqua peptonizzata (reazione alcalina).

Sintomatologìa solita, muore in circa 24 ore; all' autopsia il noto reperto, sterili le semine.

15. 2. 07.

Culture di *4 giorni*. Si filtrano e si inoculano subito.

Cavia 105. — Peso gr. 220. Riceve in peritoneo 8 c. c. di filtrato di cultura in siero di latte peptonizzato e lattosato (reazione acida).

Nessun sintoma, l' animale sopravvive.

Cavia 106. — Peso gr. 200. Riceve in peritoneo 5 c. c. di filtrato di cultura in acqua peptonizzata (reazione alcalina).

Sintomatologia solita, muore entro 20 ore; all' autopsia il noto reperto. Sterili le semine.

16. 2. 07.

Culture di *cinque giorni*. Si filtrano e si inoculano subito.

Cavia 107. — Peso gr. 215. Riceve in peritoneo 8 c. c. di filtrato di cultura in siero di latte peptonizzato e lattosato (reazione acida).

Nessun sintoma, l' animale sopravvive.

Cavia 108. — Peso gr. 210. Riceve in peritoneo 5 c. c. di filtrato di cultura in acqua peptonizzata (reazione alcalina).

Muore in circa 20 ore con il solito quadro clinico ed anatomo-patologico. Sterili le semine.

21. 2. 07.

Culture di *dieci giorni*. Si filtrano e si inoculano subito.

Età delle culture	Acqua peptonizzata			Acqua peptonizzata e lattosata			Peptogelatina Sanarelli			Siero di latte peptonizzato e lattosato		
	Kolle 74	Saïgon	Manila	Kolle 74	Saïgon	Manila	Kolle 74	Saïgon	Manila	Kolle 74	Saïgon	Manila
1 giorno	Alcalina	Alcalina	Alcalina	Alcalina	Alcalina	Alcalina lieve	Alcalina	Alcalina	Alcalina lieve	Alcalina lieve	Alcalina lieve	Alcalina netta
2 giorni	»	»	»	»	»	Alcalina forte	»	»	Alcalina netta	»	Alcalina forte	»
3 »	»	»	»	»	Acida lieve	Acida netta	»	»	»	Neutra	Alcalina lieve	Alcalina lieve
4 »	»	»	»	Neutra	Acida netta	»	»	»	»	Acida	Acida netta	Acida netta
5 »	»	»	»	Acida lieve	»	»	»	»	»	»	»	Acida forte
6 »	»	»	»	Acida netta	»	»	»	»	»	»	»	»
7 »	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»
8 »	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»
9 »	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»
10 »	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»	»

N. B. — Le reazioni sono rimaste invariate anche oltre i dieci giorni, durante il periodo in cui fu continuata l' osservazione.

Cavia 109. — Peso gr. 230. Riceve in peritoneo 8 c. c. di filtrato di cultura in siero di latte peptonizzato e lattosato (reazione acida).

La cavia è presto abbattuta e si aggrava rapidamente; muore alla 9ª ora dalla inoculazione.

All' autopsia, congestione peritoneale diffusa con copioso versamento; congesti son pure gli organi; il tenue ha contenuto diarroico. Sterili le semine.

Cavia 110. — Peso gr. 235. Riceve in peritoneo 5 c. c. di filtrato di cultura in acqua peptonizzata.

Muore in circa 21 ore con il solito quadro. Sterili le semine.

Da queste osservazioni risulta nettamente che nei primi giorni di cultura, ossia nel solo periodo in cui i vibrioni sono per gran parte normali e perciò biologicamente attivi, i filtrati delle culture in siero di latte peptonizzato e lattosato sono palesemente meno tossici; e poichè in tale mezzo si formano sostanze del tutto differenti da quelle prodottesi nei liquidi albuminoidi privi di lattosio — e delle quali abbiamo dimostrata la tossicità — resta altresì provato che le prime posseggono un potere tossico o nullo o quanto meno assai minore delle seconde.

La causa della morte della cavia 109 va, secondo noi, attribuita per la massima parte al veleno endocellulare diffusosi nel liquido in seguito alla disintegrazione del corpo microbico, giacchè abbiamo già veduto come i soli prodotti del ricambio in questo mezzo non sono tali da impartire ad esso una tossicità atta a provocare degli effetti morbosi di qualche importanza.

Certamente anche nel liquido inoculato alla cavia 110 v' era dell' endotossina; ed essa insieme ai prodotti del ricambio, che — come sappiamo — nell' acqua peptonizzata priva di lattosio hanno di per sè una tossicità marcata, ha contribuito alla morte dell' animale.

Le culture da cui provenivano questi filtrati, infatti, presentavano al microscopio una degenerazione granulare completa dei vibrioni, mista ad abbondanti detriti di corpi bacterici, e ciò spiega come nei filtrati la tossina endocellulare potesse essere presente.

Anche nei mezzi lattosati le granulazioni si formano assai speditamente, segno evidente che pure in essi, come in genere in tutti i terreni culturali conosciuti, i vibrioni trovano ben presto le condizioni più sfavorevoli per il loro sviluppo. Naturalmente non possiamo in questo caso incolparne l' ammoniaca, ma sostanze di natura affatto diversa la cui influenza sulla vegetazione dei germi è tuttavia parimenti dannosa.

Un' osservazione analoga, ma per i brodi addizionati con saccarosio, è pure stata fatta da Sclavo (1); egli vide che essi sono

---

(1) *Rivista d' Igiene e Sanità Pubblica.* 1892, p. 509.

prontamente acidificati dal vibrione colerico e che questo germe subisce in tali mezzi una rapida degenerazione morfologica e biologica, sino ad essere ucciso in 7-8 giorni sotto l'influenza esiziale dei prodotti di ricambio che si vengono formando nelle culture.

La esperienza che condusse a morte le cavie 109 e 110 fu in seguito ripetuta impiegando, invece del siero di latte, una cultura in acqua peptonizzata e lattosata che (vedi Tabella) offre le stesse caratteristiche.

. **23. 4. 07.**

Culture di *dodici giorni* di « Kolle 74 » in acqua peptonizzata e lattosata e in acqua peptonizzata semplice. La prima è acida, la seconda alcalina. In ambedue tutti i vibrioni sono granulati. Filtrate per candele Berkefeld e inoculate subito.

Cavia 180. — Peso gr. 200. Riceve in peritoneo 5 c. c. di filtrato in acqua peptonizzata e lattosata.

Poco dopo l'inoculazione è colta dai soliti sussulti spasmodici, quindi cade in un abbattimento abbastanza forte di cui si rimette dopo qualche ora. Sopravvive.

Cavia 181. — Peso gr. 230. Riceve in peritoneo 5 c. c. del filtrato di cultura in acqua peptonizzata e lattosata.

Nessun sintoma d'entità; l'animale sopravvive.

Cavia 182. Peso gr. 260. Riceve in peritoneo 10 c. c. del filtrato di cultura in acqua peptonizzata semplice.

Muore in circa 8 ore con il solito quadro.

Cavia 183. — Peso gr. 190. Riceve in peritoneo 10 c. c. del filtrato di cultura in acqua peptonizzata, lattosata.

Abbattimento passeggero di cui presto si rimette; l'animale sopravvive.

Cavia 184. — Peso gr. 170. Riceve in peritoneo 15 c. c. del filtrato di cultura in acqua peptonizzata semplice.

Muore in 7 ore con il solito quadro.

Cavia 185. — Peso gr. 240. Riceve in peritoneo 15 c. c. del filtrato di cultura in acqua peptonizzata e lattosata.

Dopo circa mezz'ora l'animale si abbatte, i sintomi si aggravano rapidamente e muore verso la 9ª ora.

Questi resultati ripetono adunque le condizioni in precedenza descritte e confermano l'ipotesi della diffusione dell'endotossina nel liquido. La quale però alla quantità di 5 c. c. non era ancora sufficente ad uccidere *di per sè sola* l'animale, e neanche alla quantità di 10 c. c. come risulta dalle cavie 181 e 183, mentre lo era nella quantità di 15 c. c. di filtrato (cavia 184). Però nel caso dell'acqua peptonizzata semplice, con l'invecchiamento delle culture le sostanze tossiche volatili si eliminano poco a poco nè sono più sostituite da nuove per la cessata attività microbica; onde noi possiamo spiegarci come

nella dose di 5 c. c. di filtrato (cavia 180) esse non fossero più contenute in quantità letale, mentre alla dose di 10 c. c. di filtrato (cavia 182) potevano ancòra concorrere, insieme alla endotossina già diffusasi, a determinare la morte dell' animale, il che invece non avveniva ancora per la stessa quantità dell' altro filtrato (cavia 183) nel quale non si può ammettere altro prodotto tossico che il *solo* veleno endocellulare sebbene in dose non mortale.

Le nostre ricerche collegate a quanto già si conosce sulla natura dei prodotti tossici del vibrione del colèra ci portano a concludere che il periodo durante il quale esso potrebbe secernere una tossina è estremamente ridotto dal rapido sopraggiungere dei fenomeni degenerativi dovuti ai prodotti del ricambio che si formano nel liquido culturale ed arrestano l' attività vitale della cellula microbica.

D' altra parte durante quello stesso periodo la tossicità dei filtrati per la massima parte è realmente dovuta a delle sostanze di natura volatile formatesi per effetto del ricambio, eliminando le quali il liquido residuale perde distintamente la sua tossicità. Perciò, anche se si volesse ammettere la presenza della tossina, la quantità ne è tanto poco apprezzabile da non potere produrre da sola alcun effetto di qualche entità negli animali a cui viene inoculata.

Infine noi crediamo che una sostanza tossica di natura protoplasmatica si vada diffondendo nel liquido culturale a misura che le culture invecchiano: questa endotossina, che è un prodotto della disaggregazione dei vibrioni in via di disfacimento dovuto alle cause da noi messe in luce, può cumulare i suoi effetti tossici a quelli delle sostanze formatesi nel liquido per opera del ricambio sino a confondersi gli uni con gli altri.

Non é quindi esatto parlare d' una tossina prodotta per secrezione dai vibrioni colerici se prima non si pongano fuori causa i prodotti tossici del ricambio, e più tardi la tossina endocellulare.

Bologna, maggio 1907